Aus dem Bakter.-serol. Institut des Allgem. städt. Krankenhauses Nürnberg
(Vorstand: Obermedizinalrat Prof. Dr. Süßmann.)

Weitere Versuche über die experimentelle Hervorrufung blutgruppenspezifischer Antikörper.

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde

der Hohen medizinischen Fakultät

der Bayerischen Friedrich-Alexanders-Universität Erlangen

vorgelegt von

Friedrich Witschel

aus Nürnberg.

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 1938.

Druck Michael Laßleben, Kallmünz

1939

1939 №140

Referent: Prof. Dr. Phil. Süßmann.

Dekan: Prof. Dr. R. Greving.

R. UNIV. BIBLIOTHEEK LEIDEN

Inhalt:

I. Entwickelung des Themas.

II. Vorversuche zur Erprobung der immunogenen Wirksamkeit von Speichelinhalationen an Kaninchen.

III. Speichelinhalationsversuch am Menschen.

I.

Erwachsene Menschen der Blutgruppe O, deren Körpersubstanz also die Isoantigene A und B nicht enthält, weisen in ihrem Serum regelmäßig Isoantistoffe gegen diese beiden Gruppenantigene auf.

Der Besitz eines Isoantigenes geht stets mit dem Mangel der Antistoffe einher, welche diesem Antigen spezifisch zugeordnet sind. A-Personen besitzen im Serum somit nur Anti-B, B-Personen nur Anti-A, das Serum von AB-Personen ist frei von beiden Isoantikörpern (Landsteinersche Regel).

Die in der Landsteinerschen Regel sich ausdrückende Unmöglichkeit des gleichzeitigen Besitzes eines Antigens und des mit ihm spezifisch reagierenden Antikörpers entspricht einer immunbiologischen Tatsache („horror autotoxicus"), die sich leicht durch die Annahme erklären läßt, daß körpereigene Antigene keinen immunogenen Reiz ausüben.

Dagegen ist das Auftreten der Gruppenantikörper an sich eine dem Verständnis nur schwer zugängliche Erscheinung.

Sie zeigen in vitro durchaus den Charakter von Immunkörpern, wie sie auf parenterale Antigenzuführung entstehen, und verhalten sich insbesondere durchaus analog den durch künstliche Immunisierung an Tieren erzeugten gruppenspezifischen Antikörpern.

Daß solche Stoffe beim Menschen innerhalb des 1. oder 2. Lebensjahres scheinbar spontan auftreten, ohne daß eine sichtbarliche Immunisierung erfolgte, ist merkwürdig. Wöhlisch (1) bezeichnet diese Tatsache als völlig rätselhaft. Auch Hirszfeld (3) nennt neuerdings die Feststellbarkeit von Anti-A und Anti-B im Serum von Menschen der Blutgruppe O einen „unerklärten Zufall".

Schließlich ist aber das häufige Vorkommen von scheinbar „angeborenen" Heteroantikörpern in der Tierwelt noch ebenso unerklärt. Wenn z. B. im Serum von Schweinen normalerweise Antikörper gegen Hammelblut und im Serum von Hammeln Antikörper gegen Meerschweinchenblut angetroffen werden, so ist das Wie und Warum des scheinbar spontanen Entstehens solcher Antikörper, die ohne ersichtliche Lebensbedeutung sind, nicht einzusehen.

Hirszfeld vertritt in seiner Monographie über die Konstitutionsserologie (2) die Auffassung, daß die normalen Antikörper spontan ausgereifte serologische Reflexe auf erblicher Grundlage seien, während die Bildung erworbener Immunkörper eine künstlich hervorgerufene Entfaltung und Verstärkung genotypisch bedingter Zellfähigkeiten darstelle.

Eine solche prinzipielle Gegensätzlichkeit normaler und erworbener spezifischer Antikörper nimmt Süßmann 1929 (in einem kurz selbstreferiertem Vortrage) nicht an. Er ist der Anschauung, daß auch die sog. angeborenen spezifischen Antikörper — und damit auch die gruppenspezifischen Isoantikörper — wie die durch künstliche Immunisierung erzeugten Antistoffe durch aktive Immunisierung erworben werden. Nur die Fähigkeit, auf einen Antigenreiz mit Antikörperbildung zu antworten, sei erblich mitbedingt; ohne den spezifischen Antigenreiz aber könne sich diese Fähigkeit nicht manifestieren (14).

Als Weg für die Zufuhr von solchen Antigenen nahm Süßmann im besonderen die Atmung an, welche dem Organismus im Lauf des Lebens unbemerkt große Mengen von körperfremden Antigenen über die Atemschleimhäute und Lungenalveolen zuleite und so zu einer „stummen Immunisierung" führe.

Dabei war er nicht der Auffassung, daß die immunisierende Substanz unbedingt „homolog", d. h. von der gleichen Art wie das Testantigen sein müsse, sondern auch „paralog" sein könne, also ganz andersartigen Stoffen entstamme, deren antigener Aufbau aber mit der Testsubstanz irgendwie übereinstimme.

Solche paraloge Antigene sind ja schon mehrfach bekannt geworden. Daß das Blutserum Fleckfieberkranker regelmäßig Proteus X 19 Bakterien agglutiniert, läßt sich nicht wohl anders deuten, als daß diese Bakterien mit dem Fleckfiebererreger in paraloger Antigenbeziehung stehen. Neuerdings wurde eine antigene Verwandtschaft von Shiga-Kruse-Bakterien mit der O-Substanz menschlicher Blutkörperchen festgestellt: wie Eisler (zit. i. 3.) zeigte und von anderen bestätigt wurde, liefern mit Shiga-Kruse-Bakterien vorbehandelte Ziegen ein Serum, das O-Blutkörperchen stark agglutiniert. Es ließen sich noch weitere Beispiele paraloger Antigene anführen, u. a. gehört der „heterogenetische" Antigenkomplex von Forßmann hieher, der auch mit dem gruppenspezifischem A-Antigen strukturverwandt ist. Es darf angenommen werden, daß derartige z. T. verwunderlich anmutende Antigenverwandtschaften in der Natur viel häufiger verbreitet sind als wir heute wissen.

Was im besonderen die Entstehung der Isoantikörper des Menschen betrifft, so dachte Süßmann wohl auch an die immunisierende Einwirkung weitverbreiteter aber noch unbekannter paraloger Antigenstoffe. Er maß aber auch der unbemerkten Aufnahme homologer Gruppenantigene große Bedeutung zu.

So stellte er die Hypothese auf, daß die fortgesetzte Einatmung von zellhaltigen Speicheltröpfchen gruppenfremder Personen im Lauf der Zeit zu einer ansteigenden Bildung gruppenspezifischer Antikörper führe. Je mehr ein Säugling in das Spielalter hineinwachse,

in umso größerem Maße wachse für ihn die Gelegenheit, Speicheltröpfchen, die andere Menschen beim Sprechen, Niesen, Husten u.sw. versprühen, durch die Atmung aufzunehmen.

Seitdem ist von Schiff (4) und Lehrs (5) festgestellt worden, daß nicht die Zellen im Speichel, sondern die Speichelflüssigkeit selbst, neben den bekannten Bestandteilen: Mucin, Ptyalin, Rhodansalzen, Calciumkarbonat und geringen Mengen von Eiweiß, sehr häufig die Blutgruppensubstanzen A, B und AB (nach Schiff auch O) enthalten.

Nach Tano Putkonen (6) hat der Speichel, wenn er Gruppensubstanz enthält, durchschnittlich sogar einen 4—32 fach höheren Receptorgehalt als die entsprechende Menge Blutkörperchen in der Konzentration, wie sie sich im Blute finden.

Der einfachste und sicherste Nachweis des Vorhandenseins von gruppenhaltiger Substanz im Speichel ist die Hemmung der Isoagglutination oder auch der Isohämolyse (5). Gelegentlich ist der Nachweis auch durch Komplementbindung möglich (Greenfield, zit. in 5.), allerdings findet im allgemeinen bei diesen Isoreaktionen selten ein nennenswerter Komplementverbrauch statt.

Schiff und Sasaki (7) unterscheiden 2 Typen von Menschen, solche, die im Speichel Blutgruppensubstanz ausscheiden und solche, die keine ausscheiden. Es gibt nach ihnen 86% „Ausscheider" und etwa 14% „Nichtausscheider". Sie stellten weiterhin fest, daß die Eigenschaft des Ausscheidens oder Nichtausscheidens ein von der Blutgruppen- und Untergruppenvererbung unabhängiges, selbständig mendelndes Merkmal ist. Dabei ist der Ausscheidungstyp dominant über den Nichtausscheidungstyp.

Nun hat sich gezeigt, daß die meisten Speichel bei längerem Stehen ihr Gruppenantigen verlieren. Man führt diesen Verlust auf die Wirkung eines zerstörenden Fermentes zurück, von dem Takeo Satoh (8) angibt, daß es fortzüchtbar sei. Der Fermentgehalt der einzelnen Speichel ist unabhängig vom Blutgruppenmerkmal, individuell verschieden und auch vom Kauen und der Nahrungsaufnahme abhängig. Stark getrübter (sehr zellhaltiger) und Nüchternspeichel enthalten im allgemeinen mehr Ferment. Die Natur dieses Fermentes ist noch nicht einwandfrei geklärt, bekannt ist nur, daß auch einige Stämme des Bacillus phlegmonis emphysematosae die Fähigkeit haben Gruppensubstanz zu zerstören (9).

Während nun dieses Ferment thermisch sehr labil ist (8—), verträgt die Gruppensubstanz ohne weiteres das Kochen, sodaß man sie auf diese Weise vom Ferment befreien kann.

Zur Frage, ob dem gruppenhaltigem Speichel die Eigenschaft eines Vollantigens zukomme, machte Lehrs (5) Immunisierungsversuche an Kaninchen durch Injektion von gruppenhaltigem mensch-

lichen Speichel, nachdem es vorher Hooker und Andersen (10) gelungen war, von Kaninchen durch Einspritzung von menschlichen Blutkörperchen gruppenspezifische Antiseren zu gewinnen. Es konnte dabei bei allen mit A-Speichel immunisierten Tieren eine deutliche Steigerung des Agglutiningehaltes für A spezifisch festgestellt werden. Außerdem enthielten diese Sera dann alle Schafbluthaemolysine. (Die Teilreceptorengemeinschaft zwischen Mensch-A und Schafblutkörperchen ist ja bekannt.) Für B-Speichel war die Titersteigerung nach Immunisierung geringer. Alle Tiere hatten zudem reichlich artspezifische Antikörper (Anti-Mensch) gebildet.

Mir wurde nun von Herrn Professor Süßmann die Aufgabe gestellt, zu versuchen, ob sich vielleicht auch durch Inhalation von gruppenantigenhaltigem menschlichen Speichel beim Kaninchen ähnliche Veränderungen im Serumtiter erreichen ließen, wie durch Injektion, und ob gegebenenfalls auch beim Menschen durch Inhalation gruppenfremden Speichels eine merkliche Agglutinintitersteigerung zu erzielen sei.

II.

Vorversuch zur Erprobung der immunogenen Wirksamkeit von Speichelinhalationen an Kaninchen.

Im Anschluß an die vorgenannten Versuche Lehrs wurde zunächst der Versuch gemacht, ob bei Kaninchen auch durch Inhalation von gruppenantigenhaltigem menschlichen Speichel eine Änderung des Serumtiters gegen menschliche A- bzw. B-Blutkörperchen zu erzielen sei.

Auswahl der Kaninchen:

Eine gewisse Schwierigkeit bei den Versuchen mit Kaninchen besteht darin, daß fast immer eine Teilreceptorengemeinschaft mit dem Menschen vorhanden ist. So haben nach Werner Fischer (11) alle Kaninchenblutkörperchen das Teilantigen B_2, außerdem soll das Serum der Kaninchen häufig menschliches A-Antigen enthalten, weshalb solche Tiere nicht zur Gewinnung von A-Antiseren geeignet seien (Horror autotoxicus!).

O. Thomsen (12) stellt allerdings fest, daß beim Kaninchen nie alle „Mosaiksteine" des menschlichen A anzutreffen seien. Immerhin empfiehlt sich eine gewisse Auswahl in der Art, daß man möglichst Tiere verwendet, von denen man annehmen kann, daß sie Antikörper bilden können, d. h. solche, deren Serum (nach Absättigung mit menschlichen O MN-Blutkörperchen) noch eine Agglutination mit A oder B, oder beiden zeigt.

Nach diesen Gesichtspunkten wurden 4 Tiere ausgewählt.

Das frisch aus der Ohrvene entnommene Blut wurde nach 2 stündigem Stehen im Kaltschrank zentrifugiert, 0,4 ccm des gewonnenen Kaninchenserums wurden mit ausgewaschenen menschlichen O MN-Blutkörperchen bis zur Reaktionslosigkeit abgesättigt. Dazu genügten zunächst in allen Fällen 0,1 ccm bei $^1/_2$ stündiger Einwirkung. Der noch vorhandene Agglutinationstiter gegen menschliche A- oder B-Blutkörperchen, bzw. gegen beide wurde nach der Schleuderröhrchenmethode (Schiff, 13) ausgewertet. Zu jedem Gläschen einer um die Hälfte fallenden Verdünnungsreihe der abgesättigten Kaninchensera wurden gleiche Teile (0,1 ccm) einer 1%igen, ausgewaschenen menschlichen A- oder B-Erythrozytenaufschwemmung (stets von den gleichen Testpersonen frisch entnommen) gegeben. Nach 5 Minuten Schütteln wurde bei 2500 Umdrehungen/min. 3 Minuten lang zentrifugiert, dann wurden die entstandenen kleinen Blutkuchen stets in der gleichen Weise vorsichtig aufgeschüttelt. Ein völliges Intaktbleiben des Blutkuchens wurde mit +++ bezeichnet, ein Zerfallen in wenige große Klümpchen mit ++, in viele kleine mit +, der Grenzfall mit $\underline{+}$, völlige Zerteilung mit —.

Als Agglutinationstiter gegen A und B nach Absättigung der Kaninchenseren mit menschlich O MN ergab sich bei 4 Tieren wie folgt:

Serumverdünnung [1]) 1:

	1.	2.	4.	8.	16.	22.
Tier 1: Flockung mit A_1	+	$\underline{+}$	—	—	—	—
„ „ B	—	—	—	—	—	—
Tier 2: Flockung mit A_1	+++	++	+	—	—	—
„ „ B	++	+	$\underline{+}$	—	—	—
Tier 3: Flockung mit A_1	—	—	—	—	—	—
„ „ B	+	—	—	—	—	—
Tier 4: Flockung mit A_1	+++	+++	+++	++	+	—
„ „ B	+++	+++	++	+	—	—

Kontrollen mit O MN in allen Fällen: —.

Diese Agglutinationstiterwerte der einzelnen Kaninchenseren erwiesen sich bei mehreren Versuchen an verschiedenen Tagen als konstant.

Kaninchen 1 und 2 wurde für die Inhalation mit A-Speichel, Kaninchen 3 und 4 für die Inhalation mit B-Speichel bestimmt.

[1]) Bei den Angaben der Serumverdünnungen handelt es sich durchweg um den Verdünnungsgrad vor der Zugabe der Blutkörperchenaufschwemmungen.

Auswahl der Speichelspender:

Der frisch produzierte Speichel einiger A- und B-Personen wurde zentrifugiert, vom Sediment abgegossen und, um das „Ferment" und vegetative Bakterien zu zerstören, im siedenden Wasserbad $^1/_4$ Stunde lang erhitzt.

Nach Abkühlung wurden kleine Speichelmengen zweier A-Personen (je 0,05 ccm) in menschliche Anti-A-Testseren (je 0,2 ccm) und ebenso Speichel zweier B-Personen in Anti-B-Testseren gegeben. Nach 9stündigem Stehen im Kaltschrank wurde unter Verwendung jeweils gleicher Testblutkörperchen geprüft, ob die flockende Kraft der Testseren herabgesetzt worden war.

Während das Anti-B-Testserum (mit dem ursprünglichen Titer von 1/1024) durch den Speichelzusatz bei beiden geprüften Personen vollkommen seiner Wirkung beraubt wurde, konnte beim Anti-A-Testserum nur in einem der beiden Versuche ein starker Titerrückgang (von 1/512 auf 1/2) festgestellt werden.

(Kontrollversuche — Testserum + gruppengleicher Speichel — ergaben keine merkliche Veränderung des Flockungstiters.)

Es standen demnach 2 B-Personen und 1 A-Person als geeignete Speichelausscheider von Gruppenantigen zur Verfügung.

Inhalationstechnik im Kaninchenversuch:

Die derart als brauchbar erwiesenen Speichel wurden mittels des Elektro-Atmosapparates (Sauerstoffzentrale Berlin N.W. Dr. Silten) zerstäubt: Die Tiere wurden durch einen über Nase und Maul gestülpten glockenförmigen Glasansatz gezwungen, den zerstäubten Speichel einzuatmen. Dies gelang nach kurzer Gewöhnung anstandslos, die Tiere schnauften ruhig und gleichmäßig.

Zunächst atmete jedes Tier in 14 aufeinanderfolgenden Tagen bei stets gleichbleibender Tourenzahl des Motors Speichel ein. Die Einatmungsdauer wurde von täglich 15 Minuten bis auf 25 Min. gesteigert. Um die Antigenzufuhr noch zu vermehren, ohne dabei die Inhalationszeit zu erhöhen, wurde zuletzt Speichel verwendet, der durch Warmluft auf die Hälfte eingedickt worden war.

Prüfung des Erfolges:

Wie schon erwähnt, hat Kaninchen 1. und 2. A-Speichel, Kaninchen 3. und 4. B-Speichel inhaliert.

3 Tage nach der letzten Inhalation wurden die Titerverhältnisse der Kaninchenseren nach Absättigung mit 0,1 ccm menschlichen O MN-Blutkörperchen wieder geprüft (vgl. Tabellen 1.—4.).

Bei allen Kaninchen ergab sich zunächst auffallenderweise eine deutliche Herabsetzung ihres Agglutinationstiters gegen die Blut-

körperchen, die antigenisch dem eingeatmeten Speichel entsprachen, und auch eine allerdings schwächere Herabsetzung des Titers gegen die Blutkörperchen der „entgegengesetzten" Blutgruppe, also eine deutliche „negative Phase".

Nach 12 Tagen aber, während derer keine Inhalation erfolgte, erwies sich der Titer bei Kaninchen 1. (A-Speichel) gegen A-Blutkörperchen auf das 4fache, bei Kaninchen 2. (A-Speichel) sogar nahezu auf das 8fache des Ausgangswertes gesteigert. Der Titer gegen B-Blutkörperchen war bei diesen beiden „A-Kaninchen" ebenfalls deutlich, wenn auch nicht im gleichen Maße gestiegen.

Bei den Tieren 3. und 4., die B-Speichel inhaliert hatten, wurde gegen menschliche B-Blutkörperchen in beiden Fällen eine Titersteigerung rund um das 4fache des Ausgangswertes gemessen. Der Anti-A-Titer war gleichfalls und zwar bei Tier 4. nur bis zum Ausgangswert, bei Tier 3. aber fast ebenso hoch, wie der Titer gegen B gestiegen.

Im Anschluß an diese Ablesungen wurden nochmals 14 Tage lang die Inhalationen mit auf die Hälfte eingedicktem Speichel fortgesetzt. Am 15. Tage wurde den Tieren zur Kontrolle wieder Blut entnommen. Jetzt trat beim Versuch, das Serum des Tieres 2. (A-Speichel) mit menschlichen O MN-Blutkörperchen abzusättigen, eine totale Haemolyse auf. Es mußte daher, um abgesättigt werden zu können, das Serum vorher inaktiviert werden (56^0, $^1/_2$ Stunde).

Bei den 3 anderen Kaninchenseren, bei welchen im Absättigungsverfahren nur eine leichte Haemolyse der zugesetzten O MN-Blutkörperchen eintrat, welche erst nach dem Abschleudern durch eine nicht sonderlich störende Rotfärbung der Seren erkannt wurde, blieb die Inaktivierung diesmal noch unterlassen. Bei den folgenden Versuchen fand jedoch eine der Absättigung vorausgehende Seruminaktivierung regelmäßig statt.

Die Ablesung ergab jetzt ebenfalls wieder eine Herabsetzung sämtlicher Titer, jedoch nicht mehr so stark, wie nach der ersten Inhalationsserie.

Nach weiteren 10 Tagen erfolgte die letzte Ablesung. Dabei stellte sich heraus, daß beim Kaninchen 2. (A.-Speichel) die Absättigung mit 0,1 ccm menschlichen O MN-Blutkörperchen nicht mehr genügte, um das Serum von den gebildeten n i c h t g r u p p e n spezifischen Antistoffen zu entleeren. Es wurden deshalb hier 0,2 ccm der O MN-Blutkörperchen dazu verwendet, die sich gerade als ausreichend erwiesen. Daraus ergibt sich offensichtlich, daß bei Kaninchen 2. der Serumtiter der gegen den Menschen artspezifisch gerichteten Antikörper stark angestiegen war. Auch bei Kaninchen 3. zeigte nach der Absättigung die Kontrolle mit O MN-Blutkörperchen im unverdünnten Serum noch eine Andeutung von Agglutination.

Blutgruppenspezifisch wurden etwa wieder die gleichen, jedenfalls keine höheren Werte erreicht, als nach der 1. Inhalationsreihe. (Einzelangaben: siehe Tabellen!)

Zusammenfassung:

In 4 Kaninchenversuchen führte die fortgesetzte Inhalierung menschlichen antigenhaltigen Speichels von Personen der Blutgruppe A und B mit ziemlicher Gleichmäßigkeit zunächst zu einem deutlichen Titerrückgang des von vornherein vorhanden gewesenen Gehalts des Serums an Anti-A bzw. Anti-B („negative Phase").

Dieser machte aber nach Unterbrechung der Inhalationen sehr bald einer beträchtlichen Steigerung über die ursprünglichen Titerwerte hinaus Platz. Wiederholungen der Versuche an den gleichen Tieren erbrachten gleichsinnige Ergebnisse.

Neben der gesteigerten Bildung von Antistoffen, die dem Gruppenantigen des eingeatmeten Speichels (A bzw. B) entsprachen, kam es aber auch, doch nicht im gleichen Maße, zu vermehrtem Gehalt von Antikörpern, welche gegen das andere Gruppenantigen (B bzw. A) gerichtet waren.

Außerdem traten auch artspezifische Haemolysine und Agglutinine gegen Menschen-Blutkörperchen überhaupt auf.

Damit war der Beweis erbracht, daß die Einatmung von gruppenantigenhaltigem Speichel kaum minder als die von Lehrs (5) vorgenommene Zufuhr auf dem Injektionsweg den Kaninchenorganismus zur Bildung von Antikörpern anregt.

Ein analoger Versuch am Menschen schien daher aussichtsreich.

Kaninchen 1. ⟨Inhalation mit A-Speichel⟩.

Titer des Kaninchenserums (nach Absättigung mit O.M.N.)

Beobachtungstage	Antigen	Inhalationsdauer	mit menschl. A_1-Blutkörp. Serumverdünnung 1:							mit menschl. B-Blutkörp. Serumverdünnung 1:							Kontrolle mit OMN 1:		Bemerkungen:
	A-Speichel		1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	8	16	32	64	1	2	je 0,4 cm³ Kaninchenserum abgesättigt mit 0,1 cm³ menschlichen OMN-Blutkörperchen.
1.			+	±	−	−	−	−	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−	
21.			+	±	−	−	−	−	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−	
22 - 25.	nicht eingedickt	je 15 Min.																	
26. – 29.	„ „	je 25 Min.																	
30. – 35.	auf die Hälfte eingedickter Speichel	je 25 Min.																	
38.			−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
50.			++	+	+	−	−	−	−	+	+	±	−	−	−	−	−	−	
51. 64.	„ „	je 25 Min.																	Geringe Rotfärbung des Serums dch. leichte Haemolyse d. Absättig. Blutes
65.			±	−	−	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−	—	
75.			++	+	±	−	−	−	−	+	±	−	−	−	−	−	−	−	Serum vor Absättigung mit OMN inaktiviert.

Kaninchen 2. ⟨Inhalation mit A – Speichel⟩

Titer des Kaninchenserums ⟨nach Absättigung mit OMN⟩

Beobachtungstage	Antigen	Inhalationsdauer	mit menschl. A_1 – Blutkörp. Serumverdünnung 1:							mit menschl. B Blutkörp. Serumverdünnung 1:							Kontrolle mit OMN 1:		Bemerkungen.
	A-Speichel		1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	8	16	32	64	1	2	je 0,4 cm³ Kaninchenserum abgesättigt mit 0,1 cm³ menschl. OMN-Blutkörperchen.
1.			++	++	+	–	–	–	–	++	+	–	–	–	–	–	–	–	
21.			++	++	+	–	–	–	–	++	+	–	–	–	–	–	–	–	
22 – 25.	nicht eingedickt	je 15 Min.																	
26. – 29.	„ „	je 25 Min.																	
30. – 35.	auf die Hälfte eingedickter Speichel	je 25 Min.																	
38.			+	±	–	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–	
50.			+++	+++	++	++	+	±	–	++	++	+	–	–	–	–	–	–	Beim Versuch mit 0,1 cm³ OMN-Blutkörp. abzusättigen tritt totale Haemolyse auf; desh. Inaktivierung. Da mit OMN-Blutkörperchen Agglutination wurde bei der Wiederholung mit 0,2 cm³ OMN-Blutkörp. abgesättigt, die sich eben als ausreichend erweisen.
51. – 64.	„ „	je 25 Min.																	
65.			+++	++	±	–	–	–	–	++	++	++	+	–	–	–	–	–	
75.																	+++	++	
75. (W)			+++	++	+	+	±	–	–	++	+	+	±	–	–	–	–	–	

Kaninchen 2. ⟨Inhalation mit A – Speichel⟩

Titer des Kaninchenserums ⟨nach Absättigung mit OMN⟩

Beobachtungstage	Antigen	Inhalationsdauer	mit menschl. A_1 – Blutkörp. Serumverdünnung 1:							mit menschl. B Blutkörp. Serumverdünnung 1:							Kontrolle mit OMN 1:		Bemerkungen.
			1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	8	16	32	64	1	2	
	A-Speichel																		je 0,4 cm³ Kaninchenserum abgesättigt mit 0,1 cm³ menschl. OMN-Blutkörperchen.
1.			++	++	+	–	–	–	–	++	+	–	–	–	–	–	–	–	
21.			++	++	+	–	–	–	–	++	+	–	–	–	–	–	–	–	
22 – 25.	nicht eingedickt	je 15 Min.																	
26. – 29.	,, ,,	je 25 Min.																	
30. – 35.	auf die Hälfte eingedickter Speichel	je 25 Min.																	
38.			+	±	–	–	–	–	–	++	–	–	–	–	–	–	–	–	
50.			+++	+++	++	++	+	±	–	++	++	+	–	–	–	–	–	–	Beim Versuch mit 0,1 cm³ OMN-Blutkörp. abzusättigen, tritt totale Haemolyse auf; desh. Inaktivierung. Da mit OMN-Blutkörperchen Agglutination wurde bei der Wiederholung: mit 0,2 cm³ OMN-Blutkörp. abgesättigt, die sich eben als ausreichend erweisen.
51. – 64.	,, ,,	je 25 Min.																	
65.			+++	++	±	–	–	–	–	++	++	++	+	–	–	–	–	–	
75.																	+++	++	
75. (W)			+++	++	+	+	±	–	–	++	+	+	±	–	–	–	–	–	

Kaninchen 3. ⟨Inhalation mit B-Speichel⟩.

Titer des Kaninchenserums ⟨nach Absättigung mit OMN⟩.

Beobachtungstage	Antigen	Inhalationsdauer	mit menschlich. B-Blutkörp. Serumverdünnung 1:							mit menschl. A_1-Blutkörp. Serumverdünnung 1:							Kontrolle mit OMN 1:		Bemerkungen:
			1	2	4	8	16	32	64	1	2	4	8	16	32	64	1	2	
	B-Speichel																		je 0,4 cm³ Kaninchenserum abgesättigt mit 0,1 cm³ menschlichen OMN-Blutkörperchen.
1.			±	−	−	−	−	−	−	±	—	−	−	−	−	−	—	−	
21.			±	−	−	−	−	−	−	±	−	−	−	−	−	−	−	−	
22. – 25.	nicht eingedickt	je 15 Min.																	
26. – 29.	„ „	je 25 Min.																	
30. – 35.	auf die Hälfte eingedickter Speichel	je 25 Min.																	
38.			−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	
50.			++	++	+	±	−	—	−	++	++	+	−	−	−	−	−	−	
51. – 64.	„ „	je 25 Min.																	
65.			+	±	−	−	−	−	−	++	+	±	−	−	−	−	−	−	Geringe Rotfärbg. d. Serums dch. leichte Haemolyse d. Absättigungsblutes.
75.			+++	++	+	±	−	−	−	++	+	+	—	−	−	−	±	−	Serum vor Absättigung ⟨mit OMN⟩ inaktiviert.

Kaninchen 4. (Inhala

Titer des Kaninchenserums (r

Beobachtungstage	Antigen	Inhalationsdauer	mit menschl. B-Blutkörp. Serumverdünnung 1:						
	B-Speichel		1	2	4	8	16	32	64
1.			+++	+++	++	+	--	--	—
21.			+++	+++	++	+	—	—	—
22. — 25.	nicht eingedickt	je 15 Min.							
26. — 29.	„ „	je 25 Min.							
30. — 35.	auf die Hälfte eingedickter Speichel	je 25 Min.							
38.			++	++	++	±	—	—	—
50.			+++	+++	+++	++	+	±	—
51. — 64.	„ „	je 25 Min.							
65.			++	++	++	+	—	—	—
75.			+++	+++	+++	+++	+	±	—

tion mit B-Speichel)

nach Absättigung mit OMN)

mit menschl. A1-Blutkörp. Serumverdünnung 1:							Kontrolle mit OMN. 1:		Bemerkungen:
1	2	4	8	16	32	64	1	2	je 0,4 cm³ Kaninchenserum abgesättigt mit 0,1 cm³ menschlichen OMN-Blutkörperchen.
+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–	
+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–	
+++	++	+	–	–	–	–	–	–	
+++	+++	+++	+++	+	±	–	–	–	
+++	+++	++	+	–	–	–	–	–	
+++	+++	+++	++	+	±	–	–	–	

III. Speichelinhalationsversuch am Menschen.

Der Besprechung des von mir vorgenommenen Selbstversuches möchte ich vorausschicken, daß A. Stärzl (15) im Jahre 1935 zwei ähnliche Inhalationsversuche am Menschen machte, allerdings nicht mit Speichel, sondern mit haemolysierten, gruppenfremden menschlichen Blutkörperchen, denen er, um evtl. die Immunisationswirkung zu erhöhen, als artfremden Eiweißkörper Schweineserum zufügte. Er konnte eine geringfügige (knapp auf das Doppelte) gruppenspezifische Titersteigerung bei den beiden Versuchsprozessen messen.

Da nun der Speichel eine 4—32 fach höhere Receptorenstärke (6) aufweist, als die entsprechende Menge Blutkörperchen in der natürlichen Konzentration des Blutes, so konnte man mit Speichelinhalationen, die nach der eingangs besprochenen Anschauung Süßmanns „eine konzentrierte Nachahmung von Bedingungen des täglichen Lebens" darstellen, vielleicht mit einer ausgiebigeren oder rascheren Wirkung rechnen.

Versuchsanordnung und Technik:

Die Versuchsperson besitzt die Blutgruppe A_1 MN. Ihr Serum hatte mit stets denselben B MN-Blutkörperchen in größeren Zeitabständen gemessen (nach Schleuderröhrchenmethode) gleichbleibend die folgenden Isoagglutinationswerte:

Serumverdünnung: 1:	1	2.	4.	8.	16.	32.	64.
	+++	+++	+++	+++	++	+	—

Als Antigen kam der gleiche B-Speichel zur Verwendung, den die Kaninchen 3. und 4. inhaliert hatten. Er hatte bekanntlich die Eigenschaft in einer Menge von 0,05 ccm die Agglutinine in 0,2 ccm eines Anti-B-Serums (mit dem Titer 1/1024) vollständig unwirksam zu machen (vgl. oben!).

Der Speichel wurde ebenso vorbehandelt, wie bei den Kaninchenversuchen, nämlich zentrifugiert und 15 Minuten im siedenden Wasserbad erhitzt. Die Zerstäubung erfolgte ebenfalls wieder mittels des Elektro-Atmosapparates. In das Vernebelungsglas wurde zu etwa 4 ccm Speichel als Geschmacks- und Geruchskorrigens 1 Tropfen einer 10%igen alkoholischen Menthollösung gegeben. Der zerstäubte Speichel wurde durch ein doppeltes Nasenansatzstück bei geschlossenem Munde tief eingeatmet. Die Tourenzahl des Motors war konstant.

Prüfung des Erfolges:

Wie aus dem folgenden Versuchsprotokoll hervorgeht, trat hier, wie bei den Kaninchen zunächst ebenfalls und zwar schon nach

6 tägiger, allerdings ziemlich forcierter Inhalation (3 Tage je 30 Min. und 3 Tage je 45 Min.) eine deutliche Senkung des Serumagglutinationstiters (von $^1/_{32}$ auf $^1/_{16}$) auf.

Schon nach 3 Tagen Inhalationspause zeigte sich aber, daß der Serumtiter auf $^1/_{128}$ angestiegen war, also auf das 4-fache des vorher mehrmals bestimmten Ausgangswertes. (Die Ablesung wurde von mehreren Beobachtern kontrolliert.)

Bei der Fortsetzung dieser Versuche unter noch weiter gesteigerter Inhalationsdauer (bis auf 60 Min. tgl.) mit insgesamt 15 Inhalationen sank der Serumtiter ziemlich rasch wieder ab, allerdings nur noch bis zum Ausgangswert, nicht mehr darunter. Nach Aussetzen dieser Inhalationen dauerte es diesmal 6 Tage bis wiederum der Titerwert von $^1/_{128}$ erreicht war.

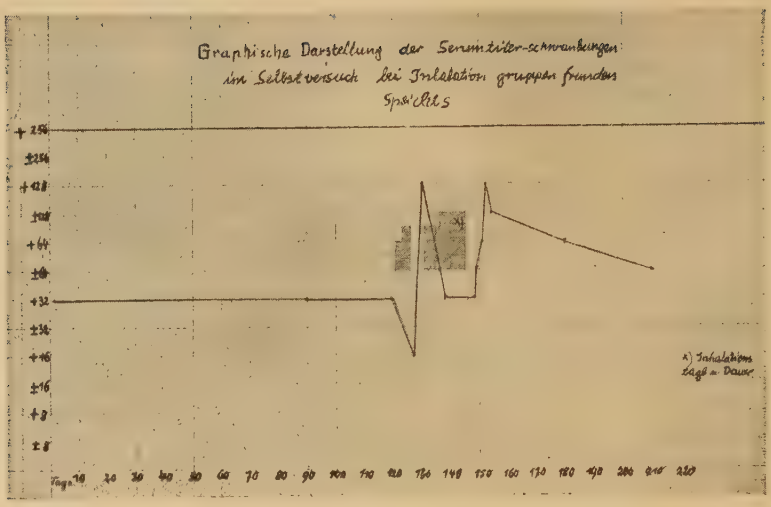
Höher stieg jedoch der Serumtiter auch nach diesen sehr kräftigen Inhalationen nicht an.

Selbstversuch:

Bluttypus des Empfängers: A_1 MN

Inhalationen mit B-Speichel.

Beobachtungstage	Inhal. Dauer mit B-Speich.	Titer des Empfänger-Serums mit B-Blutk. Serumverdünnung 1:								
		1	2	4	8	16	32	64	128	256
1.		+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–
90.		+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–
120.		+++	+++	+++	+++	++	+	–		–
121.—123.	je 30 Min.									
124.—126.	je 45 Min.									
127.		+++	+++	+++	++	+	–	–	–	–
130.		+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	–
131.—135.	je 45 Min.									
136 (—138.)	je 60 Min.	+++	+++	+++	+++	+++	+	±	–	–
138.		+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–
139.—145.	je 60 Min.									
146.		+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–
147.		+++	+++	+++	+++	++	+	–	–	–
148.		+++	+++	+++	+++	+++	++	–	–	–
149.		+++	+++	+++	+++	+++	++	±	–	–
150.		+++	+++	+++	+++	+++	++	±	–	–
151.		+++	+++	+++	+++	+++	++	+	–	–
152.		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	–
154.		+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	±	–
180.		+++	+++	+++	+++	++	++	+	–	–
210.		+++	+++	+++	+++	++	++	±	–	–



Er sank schon nach 2 Tagen gering ab, nach $3^1/_2$ Wochen war er bereits um die Hälfte gesunken und nach einem weiteren Monat war der Ausgangswert fast wieder erreicht.

(Über den genauen Ablauf der Titerschwankungen: siehe Tabelle und Kurve!)

Die Anschauung Thomsens, daß erwachsene Personen ihre Fähigkeit Gruppenagglutinine zu bilden, bis zur Sättigung entwikkelt haben, müßte demnach eingeschränkt werden: nämlich insoferne als dieser Satz nur für die Bedingungen gilt, die das normale Leben mit seinen verschiedenen Antigenangeboten schafft, daß aber bei konzentriertem Angebot doch noch eine gewisse Steigerung möglich ist, wie die vorgenommenen Speichelinhalationen zeigen.

Mag es sich zunächst auch nur um einen einzigen Versuch handeln, so spricht die grundsätzliche Übereinstimmung der Ergebnisse mit den Resultaten der Kaninchenversuche doch dafür, daß sich in ihm ein allgemeingültiges immunbiologisches Geschehen dokumentiert.

Die Hypothese S ü ß m a n n s von einer gegenseitigen „Gruppen-Immunisierung" erfährt durch ihn jedenfalls eine Stütze.

Es wäre immerhin wünschenswert, daß derartige Versuche in größerer Anzahl unter wechselnden Versuchsbedingungen wiederholt würden. Dazu kann mein Selbstversuch methodisch-technische Grundlagen bieten.

Die Gewinnung des Antigens (Speichel) und seine Vorbereitung macht keine Schwierigkeiten. Die Blutentnahme aus dem Ohrläpp-

chen ist fast schmerzlos und reicht zur Agglutinationstiterbestimmung im Serum völlig aus, Venenpunktion ist nicht nötig. Die Einatmung des Speichels ist bei Zusatz von etwas Menthol völlig belästigungsfrei, nur darf die spendende Person nicht unmittelbar vorher rauchen. Wie ich mich im Selbstversuch überzeugen konnte, wird das Allgemeinbefinden in keiner Weise gestört. Irgendwelche Überempfindlichkeitssymptome, wie Temperatursteigerungen, Hautausschläge, asthmatische Erscheinungen oder dgl. traten auch bei forcierter Einatmung nicht auf. Gegenüber der Injektion der Antigene ist die Inhalation von Vorteil, sowohl durch die leichte Handhabung, als auch durch absolute Schmerzfreiheit und Fortfall jeglicher Infektionsgefahr.

Da also ärztliche Einwendungen gegen die Vornahme von weiteren Speichelinhalationen wohl nicht bestehen, könnte es vielleicht gelingen, bei verständigen Eltern, den begreiflichen Widerstand gegen solche Versuche auch bei Kleinkindern zu überwinden.

Zusammenfassung:

1. Zur Klärung, ob spezifische Blutgruppenagglutinine durch Einatmung von gruppenhaltigem Speichel entstehen, bzw. gesteigert werden können, wurden an 4 Kaninchen und im Selbstversuch am Menschen gruppenfremder Speichel inhalatorisch einverleibt.
2. Es wurde bei Mensch und Tier übereinstimmend zuerst eine deutliche Titerminderung („negative Phase"), nach Aussetzen der Inhalationen sehr bald eine deutliche Steigerung der gruppenspezifischen, bei den Tieren auch der artspezifischen Agglutinine (und Haemolysine) festgestellt.
3. Die von Süßmann vorgeschlagene Methodik erwies sich als ungefährlich und leicht zu handhaben, sodaß gegen ihre weitere Anwendung keine Bedenken bestehen.

Literaturverzeichnis:

1. Wöhlisch, Edgar: Medizinische Welt, 10. Jahrgang Nr. 10.
2. L. Hirszfeld: Über die Konstitutionsserologie im Zusammenhang mit der Blutgruppenforschung, in „Ergebnisse der Hygiene", Band 8, S. 367 ff.
3. L. Hirszfeld: in Schweizerische Wochenschrift für Allgemeine Pathologie und Bakteriologie, Bd. I. 1938. Heft 1, Seite 23—49.
4. F. Schiff: Über die gruppenspezifischen Substanzen des menschlichen Körpers. Habil. Schrift. Fischer 1931, Jena
5. H. Lehrs: Über die gruppenspezifischen Eigenschaften des menschlichen Speichels. Zeitschrift für Immunforschung 66, S. 175.
6. Tano Putkonen: Akademische Abhandlungen 1930, Helsingfors Acta Soz. Mediz. Duodezim, Ser. A. T. XIV, Fac. 2.
7. Schiff und Sasaki: „Der Ausscheidungstyp ein auf serologischem Wege nachweisbares, mendelndes Merkmal", Klin. Wochenschr. 1932, Nr. 34.
8. Takeo Satoh: „Blutgruppensubstanz und Blutgruppenferment im Speichel. Klinische Wochenschrift 1934, Nr. 22.
9. F. Schiff: „Über den Abbau gruppenspezifischer Substanzen durch Bakterien", Klinische Wochenschrift 1935, Nr. 21.
10. Hooker und Adersen zit. nach Steffan „Handbuch der Blutgruppenkunde", Verlag Lehmann 1932, S. 76.
11. Werner Fischer: „Über Blutgruppeneigenschaften beim Kaninchen", Zeitschrift für Immunforschung, Bd. 86, 1935.
12. O. Thomsen, zit. nach Steffan, Handbuch der Blutgruppenkunde.
13. Schiff, Technik der Blutgruppenuntersuchung, Verlag Springer, Berlin 1932, Seite 97.
14. Süßmann, Philippo: Vortrag gehalten am 3. 10. 29 im ärztlichen Verein Nürnberg. „Die menschlichen Blutgruppen, ihre Bestimmung und ihre Bedeutung". (Autoreferat).
15. Stärzl, Alfred: Inauguraldissertation 1935.

Meinem verehrten Lehrer, Herrn Stadtobermedizinalrat Professor Dr. Süßmann, möchte ich an dieser Stelle meinen verbindlichsten Dank für die Anregung zu dieser Arbeit, für die liebenswürdige Unterstützung bei der Abfassung derselben, sowie für die freund- Übernahme des Referates aussprechen.

Lebenslauf.

Als Sohn des prakt. Arztes Dr. Wilhelm Witschel wurde ich am 3. Mai 1909 in Nürnberg geboren. Nach Erlangung des Reifezeugnisses am Melanchthon-Gymnasium zu Nürnberg besuchte ich zunächst die Universität Erlangen, wo ich nach 5 vorklinischen Semestern die medizinische Vorprüfung ablegte. Meine klinischen Semester verbrachte ich an den Universitäten Kiel, München und Erlangen. Im Dezember 1934 bestand ich in Erlangen das medizinische Staatsexamen. Als Medizinalpraktikant war ich am Städtischen Krankenhaus Nürnberg tätig und zwar 5 Monate auf der 1. Med. Klinik und 7 Monate auf der Chirurgischen Klinik. Nach der Approbation, die ich am 15. Januar 1936 erhielt, war ich zunächst 2 Monate auf der Nürnberger Städtischen Frauenklinik als Gastarzt. Vom 1. Mai 1936 bis Ende Mai 1937 war ich Assistenzarzt an der Universitätshautklinik in Würzburg. Am 30. September 1936 verheiratete ich mich mit Käthe, Luise, geb. Tramsen aus Innien in Holstein. Aus dieser Ehe wurde am 12. Juli 1937 ein Sohn geboren. In der Zeit von Juli bis Oktober 1937 habe ich verschiedene Ärzte vertreten. Vom 1. Oktober bis 31. Dezember 1937 habe ich in Weißenburg bei Dr. Dörfler das Landvierteljahr gemacht. Seit 1. Januar 1938 bin ich als Assistenzarzt an der 1. Medizinischen Klinik des Städtischen Krankenhauses Nürnberg tätig.